

Botrytis cinereaによるチコリー灰色かび病（新称）の発生

誌名	北日本病害虫研究会報
ISSN	0368623X
著者名	高橋,智恵子 山村,真弓 月星,隆雄
発行元	北日本病害虫研究会
巻/号	60号
巻号補足	
掲載ページ	p. 122-125
発行年月	2009年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



Botrytis cinerea によるチコリー灰色かび病 (新称) の発生

高橋智恵子*・山村真弓*・月星隆雄**

Gray Mold, a New Disease of Chicory Caused by *Botrytis cinerea* in Japann

Chieko TAKAHASHI*, Mayumi YAMAMURA* and Takao TSUKIBOSHI**

宮城県内において、チコリー (品種: プンタレッラ) の葉身が褐変し、次第に株元まで及んで腐敗・枯死する症状が多発した。罹病部からは *Botrytis* 属菌が高率に分離され、これをチコリー健全株に接種したところ病原性が確認された。分離菌は培養特性、形態的特徴、rDNA-ITS および G3PDH 領域の相同性から *Botrytis cinerea* と同定された。本菌によるチコリーの病害は国内では未報告であるため、本病を *Botrytis cinerea* によるチコリー灰色かび病 (新称) としたい。

Key words: *Botrytis cinerea*, chicory, *Cichorium intybus* L., gray mold, puntarella

チコリー (*Cichorium intybus* L.) はキク科の多年草で、暗黒下で軟白栽培した芽を食用とするが、プンタレッラあるいはアスパラガスチコリーと呼ばれる品種は、軟白せずに栽培し、空洞になった花茎と葉を食する。宮城県では平成 18 年から本品種の導入が進み、県南部を中心に約 50 a 作付けされている。主として施設で無加温栽培されており、8 月下旬～9 月上旬に定植、12 月～3 月に茎葉が収穫される。2008 年 12 月、本種の生育中の株において葉身が褐変、これが拡大して、株元にまで及ぶ症状が多発した。そこで、病害の診断および病原菌の特定を目的として本研究を行った。

材料および方法

1. 病徴の観察および病原菌の分離

2008 年 12 月上旬に宮城県農業・園芸総合研究所 (宮城県名取市) のハウス内で発病したチコリー株 (品種: プンタレッラ) について、病徴の経日的な観察を行った。病原菌の分離は以下のように行った。罹病部を約 5mm の細片に切断後、70% エタノールに 30 秒、次いで 1% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 1 分間浸漬して表面殺菌し、滅菌水で 2 回洗浄した。これを素寒天 (WA) 培地上に置床した。25℃ で 3 日間培養後、組織片から伸長した菌糸の先端を切り取ってジャガイモブドウ糖寒天培地

(PDA, DIFCO 製) 上に置床し、25℃ 暗黒下で 3 日間培養した。胞子形成を促すために BLB 照射 (National FL10BL-B 2 灯) を 2 日間行なった後、再度 25℃ 暗黒下で 3～4 日間培養した。形成した胞子を直接白金耳でかき取って WA 上に画線することで単胞子分離を行った。また、罹病部に形成した胞子も同様に単胞子分離し、計 9 菌株 (PB-1～9) を得た。このうち代表菌株として、PB-2 を以下の試験に供試した。

2. 病原性検定

試験 1: 温室で約 4 ヶ月間栽培した株 (品種: プンタレッラ) から切り出した約 20cm 長の健全新葉を病原性検定に供試した。PDA 平板培地上に形成した分離菌株の胞子を滅菌水に懸濁し (胞子濃度 8.7×10^6 個/ml), 1 区 (葉身 6 枚) あたり約 10ml を噴霧した。対照区は同量の滅菌水を噴霧した。接種は有傷および無傷区をそれぞれ設けて各区 6 枚とし、有傷区では柄付針により葉身 1 枚あたり 1 ヶ所に 6 針の刺傷とした。接種後はそれぞれの葉身基部を滅菌水で湿らせた脱脂綿で覆い、さらにアルミホイルで覆った。それらを湿らせたキムワイブを敷いたプラスチックのバット上に並べ、バットごと透明ビニールの中に入れて密閉した。25℃ の暗黒下で 2 日間保湿した後、ビニール袋から出して 22℃ のガラス温室内で管理した。接種 7 日後に発病の有無を調査するとともに、罹病

*宮城県農業・園芸総合研究所 Miyagi Prefectural Agriculture and Horticulture Research Center, Takadate, Natori, Miyagi 981-1243, JAPAN

**農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所

部からは接種菌の再分離を試みた。

試験2：直径20cmのポットで約2ヶ月間栽培した株（品種：ブントレタ、草丈25cm程度）を病原性試験に供試した。分離菌株の胞子懸濁液（ 9.2×10^5 個/ml）を1株あたり30ml噴霧し、対照区には同量の滅菌水を噴霧

した。供試植物は有傷区、無傷区および対照区の各区3株計9株とした。葉身への付傷は試験1と同様の方法で行った。接種後は23℃の恒温接種装置内で2日間保持し、その後の管理は試験1と同様とした。



第1図 病徴と病原菌の形態的特徴

- a : 花茎部先端葉の病徴（自然病徴）.
- b : 葉柄および株元の褐変（自然病徴）.
- c : 接種7日後の病斑（株への有傷噴霧接種）.
- d : 葉枯れ症状と胞子（株への有傷噴霧接種）.
- e : 分生子および分生子柄.
- f : PDA培地上の菌叢と菌核（23℃培養、分離菌株PB-2）.
- g : SEM観察による分生子の表面構造.

3. 菌糸伸長に及ぼす培養温度の影響

分離菌株を PDA 平板培地上で 20℃、3 日間培養し、菌叢周縁部を 5mm のコルクボーラーで打ち抜き、これを直径 9cm の PDA 平板培地上に置床した。暗黒条件で 3 日間培養後、菌叢の直径を測定し、1 日あたりの菌糸伸長量を算出した。培養温度は 5、10、15、20、23、25、28、30、35 および 40℃ の 10 段階とし、4 反復で行った。

4. 分離菌の同定

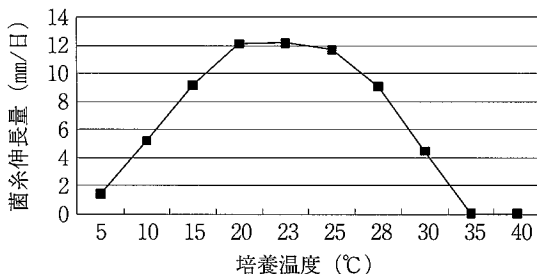
分離菌の形態は、分離菌株を PDA 平板培地上で 20℃ の暗黒条件下で培養後、菌叢を肉眼で観察するとともに光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡 (SEM, JSM-5200) で観察した。SEM 観察には、両面粘着テープを菌叢に接触させて分生子柄、菌糸とともに分生子を捕捉した後、金で蒸着し、加速電圧は 25kV として観察した。

分離菌株のリボゾーム DNA の 5.8S を含む ITS1、ITS2 領域 (rDNA-ITS) およびグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素遺伝子 (G3PDH) の塩基配列は、White *et al.* (6) の方法に基づいて、プライマー ITS1 および ITS4 を用いて得られた増幅断片および Staats *et al.* (4) の方法に基づいて得られた増幅断片を鋳型として決定した。得られた塩基配列は、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の BLAST 検索により、既報の病原菌の塩基配列と相同性を比較した。

結果および考察

1. 病徴および発生状況

2008 年 12 月、研究所のハウス内で栽培中のチコリー



第2図 各培養温度におけるチコリー分離菌株 PB-2 の菌糸伸長量

(品種:ブンタレッラ)の葉先および葉身に褐変が見られ、特に抽台した花茎の上位葉および苞葉が褐変し (第1図-a), 病勢が進展すると軟化・腐敗し、多湿時には罹病部に大量の胞子を形成した。これらは収穫部位となるため、収量が大きく減少する原因となった。さらに重症化すると病斑が株元まで及び (第1図-b), 腐敗・枯死する株も認められた。これら罹病部からは *Botrytis* 属菌が高率に分離された。同様の症状は 2008 年 11 月下旬頃から生産者のハウスでも散見された。本植物は主に無加温ハウスで栽培されるため、この時期の施設内は結露しやすい環境下であった。また、3 月になると本病の顕著な発生拡大は認められなくなった。

2. 病原性検定

チコリー (品種:ブンタレッラ) の切離葉に胞子懸濁液の噴霧接種を行ったところ、有傷区では接種 3 日後、葉に直径 5mm 程度の褐色の円形病斑が現われ、7 日後には病斑がさらに拡大した。無傷区では 10 日後でも病斑が確認できなかった。株への噴霧接種試験では、有傷区で接種 3 日後に葉に直径 5mm 程度の明瞭な円形病斑が形成され、次第に病斑が拡大した (第1図-c)。病斑は表面に胞子を形成して最終的には葉枯れとなった (第1図-d)。しかし、無傷区では病斑が形成されなかった。両試験とも罹病部からは接種菌と同一菌が再分離された。対照区ではいずれの区においても病斑は全く形成されなかった。

3. 菌糸伸長に及ぼす培養温度の影響

本菌の PDA 平板培地上における生育適温は 20~23℃ で、適温での生育速度は約 12mm/日と速やかであった。本菌は 5℃ でもわずかに生育が認められたが、35℃ および 40℃ では全く生育しなかった (第2図)。

4. 病原菌の形態および同定

PDA 平板培地上での菌叢は初めは白色を呈し、後に灰褐色となり (第1図-f)、培地上に直径 1~6mm の黒色で不整形の菌核を多数形成し、Tomioka *et al.* (5) の *B. cinerea* の記載と概ね一致した (第1表)。分生子柄は淡褐色~褐色で先端が樹枝状に分岐し、房状に分生子を形成した (第1図-e)。分生子は無色から淡褐色、単胞、楕円~卵形、大きさは 7.5~13.8×5.0~10.0 μm で、Ellis (1) の *B. cinerea* の記載とほぼ一致した。また、SEM による観察では、分生子表面に多数のいぼ状突起が認められ、

第1表 チコリーからの分離菌株と *Botrytis cinerea* の形態比較

	分生子					菌核	
	大きさ:縦×横 (μm)	長径/短径比	形状	表面構造 (SEM)	色	大きさ (mm)	形状
チコリー分離菌株 (PB-2)	7.5~13.8×5.0~10.0	1.03~1.96	楕円~卵形	いぼ状	無色~淡褐色	1~6	不整形
<i>Botrytis cinerea</i> ¹⁾	6~18×4~11	1.35~1.5	楕円~卵形	-	無色~淡褐色	-	基質により変化する
<i>Botrytis cinerea</i> ²⁾	9.3×5.4	1.75	-	いぼ状	-	-	-
<i>Botrytis cinerea</i> ³⁾	7~13×5~10	-	楕円~倒卵形	-	淡褐色	<5	-

1) Ellis, M. B. (1)

2) 堀内ら (3)

3) Tomioka, K. *et al.* (5)

堀内ら (3) の *B. cinerea* の記載と一致した (第 1 図-g). これらの培養特性および形態的特徴から分離菌株は *B. cinerea* と考えられた.

rDNA-ITS 領域の解析の結果, 分離菌株の配列は *B. cinerea* (DDBJ Accession No. Z99664 他と 99.8% (452/453bp) の相同性であった. また, *Botrytis* 属内の分類で補足的に用いられることのある G3PDH 遺伝子の配列も, *B. cinerea* (DDBJ Accession No. AJ705006 と 100% (886/886bp) の相同性で一致した. これら塩基配列解析の結果は培養特性および形態的特徴に基づく結果を支持したことから, 本分離菌を *Botrytis cinerea* Persoon: Fries と同定した.

本菌によるチコリーの病害はアメリカ合衆国での発生報告がある (2). *Botrytis cinerea* によるチコリーの病害は国内では未報告のため, チコリー灰色かび病 (英名: Gray mold) と提案したい.

引用文献

- 1) Ellis, M. B. (1971) Dematiaceous Hyphomycetes. C.M.I., Kew, England, pp.178-184.
- 2) Farr, D. F., Bills, G. F., Chamuris, G. P. and Rossman, A. Y. (1989) Fungi on Plants and Plant Products in the United States. APS Press, Minnesota, USA, 1252pp.
- 3) 堀内誠三・堀 真雄・石井正義 (1978) 走査電顕観察による数種 *Botrytis* 属菌の同定. 中国農試報 E13 : 53-87.
- 4) Staats, M., van Baarlen, P. and van Kan, A. L. (2005) Molecular Phylogeny of the Plant Pathogenic Genus *Botrytis* and the Evolution of Host Specificity. Mol. Biol. Evol. 22 : 333-346.
- 5) Tomioka, K., Sawada, H., Aoki, T. and Sato, T. (2008) Gray mold of pearl lupine caused by *Botrytis cinerea*. J. Gen. Plant Pathol. 74(5) : 405-407.
- 6) White T. J., Bruns T., Lee S. B., Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, M., Sninsky, D., White, T. J. (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, California, USA, pp.315-322.